微藻不同光合荧光参数对氯化消毒副产物毒性响应特性

甘婷婷[1,2,3]，殷高方[1,2,3*]，赵南京[1,2,3**]，汪颖[1,2,3]，谭小璇[1,2,3]，叶紫琪[4]

[1]中国科学院合肥物质科学研究院安徽光学精密机械研究所中国科学院环境光学与技术重点实验室，安徽 合肥 230031；
[2]中国科学技术大学，安徽 合肥 230026；
[3]安徽省环境光学监测技术重点实验室，安徽 合肥 230031；
[4]合肥工业大学，安徽 合肥 230009

摘要　以淡水微藻中的蛋白核小球藻为受试生物，以典型毒性氯化消毒副产物氯乙酸及三氯乙腈为研究对象，采用荧光动力学方法研究了 4 种光合荧光参数 F_v/F_m、F_v/F_o、F_m/F_o（F_o 为初始荧光强度，F_m 为最大荧光强度，$F_v = F_m - F_o$）及 PI_{ABS} 对两种消毒副产物的响应规律，并分别从对低质量浓度与等质量浓度消毒副产物响应性能、10% 效应质量浓度（EC_{10}）与 50% 效应质量浓度（EC_{50}）值 4 个方面对比了 4 个光合荧光参数的响应灵敏性。结果表明：4 个参数对两种消毒副产物都具有质量浓度响应特性，抑制率与消毒副产物质量浓度之间都具有较好的 Logistic 曲线型剂量-效应关系，修正相关系数 R^2_{adj} 均大于 0.993，其中 PI_{ABS} 的 R^2_{adj} 最大；4 个参数对两种消毒副产物毒性的响应灵敏性从大到小的排序均为 PI_{ABS}、F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m，因此 PI_{ABS} 是基于荧光动力学方法检测水体氯化消毒副产物毒性较为灵敏的响应指标。该研究结果为发展水体消毒副产物毒性的现场快速检测方法与技术提供了重要参考。

关键词　光谱学；荧光；氯化消毒副产物；生物毒性；微藻；荧光动力学；光合荧光参数

中图分类号　X832　　　**文献标志码**　A　　　　　　　　　　**DOI**：10.3788/AOS230766

1　引　言

为保障人体健康，消毒已成为灭活病原微生物、降低疾病传播风险的重要手段[1-2]。在多种消毒剂中，氯化消毒剂（如氯气、二氧化氯、氯胺、次氯酸等）因具有对病原微生物灭活效果好、消毒效率高、使用成本低等优点[3-4]，已被广泛应用于污水厂、医院及日常生活消毒的各个方面。自新冠肺炎疫情暴发以来，含氯消毒剂在不同场所的使用频率更高、剂量更大[5-6]。氯化消毒剂的大规模使用会导致大量余氯与水中有机物反应，生成含量更高的氯化消毒副产物（DBPs），如卤乙酸、卤乙腈、卤代甲烷、卤代硝基甲烷等，对人体健康产生诸多不良影响[7-8]，随尾水进入自然水体中的消毒副产物甚至会对水生生物产生毒害效应，进而对水生态环境构成严重威胁。因此，水环境中氯化消毒副产物毒性的快速检测已成为当前的研究热点。

微藻作为水生态系统中的主要初级生产者及能量转换者[9]，由于个体小、对毒物敏感，是水生态环境中最容易受到毒性物质伤害的水生生物，因此微藻的生理及生长状态对水质状况具有重要的指示作用。微藻的光合作用作为水生态系统初级生产的原动力，是藻细胞生长繁殖及代谢的重要基础。已有研究[10-13]表明，藻细胞的光合状态对水体污染物的毒性具有快速响应特性，因此基于微藻光合状态的改变能够快速评估污染物的毒性。

荧光动力学方法是一种非破坏性的活体植物荧光测量方法，能够快速获取表征植物光合状态的多种光合荧光参数[14]，在研究植物光合作用过程、逆境环境对植物光合作用影响方面具有重要作用，更是水环境污染物毒性现场快速检测的重要技术手段。目前，以微藻为受试生物，采用荧光动力学方法分析污染物毒性时所用的光合荧光参数较多，不同光合荧光参数对污染物的毒性响应特性也有所不同，例如：光系统 Ⅱ（PS Ⅱ）最大光化学量子产率 F_v/F_m 是分析环境因素及污染物毒性对植物光合活性影响最为常用的光合荧光参数[15-16]；Lichtenthaler 等[17-18]研究发现，与 F_v/F_m 相比，光合活性参数 F_v/F_o 及 F_m/F_o 能够更为灵敏地反映光照条件及灰尘沉积对高等植物光合活性的影响；Sun 等[9]

研究发现,光合活性参数 PI_{ABS} 是评估除草剂阿特拉津对小球藻（*Chlorella pyrenoidosa*）毒性最为敏感的响应指标。但这些光合荧光参数对水体中消毒副产物的毒性响应特性目前尚且未知。明确对消毒副产物具有灵敏毒性响应特性的光合荧光参数对于发展基于荧光动力学技术的水体消毒副产物毒性快速检测方法具有重要的意义。

氯乙酸与三氯乙腈是氯化消毒后产生的具有生物毒性的典型氯化消毒副产物。为了实现氯化消毒副产物毒性的快速灵敏检测,本文以水体中较为常见的淡水微藻蛋白核小球藻为受试生物,以典型氯化消毒副产物氯乙酸及三氯乙腈为研究对象,采用荧光动力学方法研究蛋白核小球藻 4 个光合荧光参数 F_v/F_m、F_v/F_o、F_v/F_m（F_o 为初始荧光强度,F_m 为最大荧光强度,$F_v = F_m - F_o$）及 PI_{ABS} 对两种氯化消毒副产物毒性的响应特性,进而优选出对水体氯化消毒副产物具有高灵敏度且良好定量响应性能的光合荧光参数,为后续建立水体消毒副产物毒性现场快速定量检测方法提供重要依据。

2 材料与方法

2.1 藻种培养与溶液配制

所用的淡水微藻蛋白核小球藻（FACHB-5）购于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。将该藻种无菌接种于 BG11 培养基中,置于恒温光照培养箱（MQD-S3R,上海旻泉仪器有限公司,中国）中进行扩大培养。培养条件设置如下:温度为（25±1）℃,光照强度为 120 μmol·m^{-2}·s^{-1},光暗时间比为 12 h:12 h。每天使用生物荧光显微镜（ECLIPSE Ni-U,尼通,日本）对藻种培养液的藻细胞密度进行检测。当蛋白核小球藻培养 3～4 天进入对数生长期时,将其用于氯化消毒副产物的暴露实验。

所用的氯乙酸购于国药集团化学试剂有限公司,为分析纯,纯度≥99%;三氯乙腈购于阿拉丁试剂（上海）有限公司,为分析纯,纯度≥98%。暴露实验前采用无菌 BG11 培养基分别配制质量浓度为 2 g·L^{-1} 的氯乙酸储备液及三氯乙腈储备液,并用无菌 BG11 培养基对蛋白核小球藻培养液进行稀释。取 20 mL 稀释后藻液于 50 mL 容量瓶中,并加入一定体积（<400 μL）的氯乙酸或三氯乙腈储备液,配制不同质量浓度氯乙酸及三氯乙腈胁迫下的蛋白核小球藻测量样品,最终每个测试藻样中蛋白核小球藻的细胞密度为 5×10^5 cells·mL^{-1},氯乙酸的质量浓度分别为 0、5.06、10.12、12.88、15.64、18.40、20.17、23.00、27.60、32.20、36.80 mg·L^{-1},三氯乙腈的质量浓度分别为 0、1.55、3.09、4.63、6.18、7.73、9.66、11.60、13.53、15.46、19.32 mg·L^{-1},其中以不加入氯乙酸及三氯乙腈储备液的 20 mL 细胞密度为 5×10^5 cells·mL^{-1} 的蛋白核小球藻悬浮液为空白对照样。每一个质量浓度氯乙酸及三氯乙腈胁迫下的蛋白核小球藻样品及空白对照样品均以同样的方式配制 3 份平行样。将配制好的测试藻样置于恒温光照培养箱中,在与上述培养条件相同的环境下进行培养。

2.2 光合荧光参数获取

所有测试藻样经过 15 min 暗适应后,采用 AquaPen AP110/C 藻类荧光测量仪（Photon Systems Instruments 公司,捷克）在饱和光脉冲强度为 1800 μmol·m^{-2}·s^{-1} 的 455 nm 光激发下进行快速叶绿素荧光上升动力学曲线测量。根据获得的快速叶绿素荧光上升动力学曲线,提取曲线中的初始荧光强度 F_o 及最大荧光强度 F_m,根据两个荧光强度的比值计算光合荧光参数 F_m/F_o;根据式（1）和式（2）分别计算光合荧光参数 F_v/F_o、F_v/F_m,并根据仪器系统的 JIP-test 软件直接获取光合荧光参数 PI_{ABS},不同光合荧光参数的物理意义如表 1 所示。

$$\frac{F_v}{F_o} = \frac{F_m - F_o}{F_o}, \tag{1}$$

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m}。 \tag{2}$$

表 1 不同光合荧光参数的物理意义

Table 1　Physical significance of different photosynthetic fluorescence parameters

Parameter	Physical significance
F_m/F_o	Quantum yield of PSⅡ electron transport[19]
F_v/F_o	Potential PSⅡ quantum yield[19]
F_v/F_m	The maximum photochemical quantum yield of PSⅡ[15]
PI_{ABS}	Performance index for energy conservation from photons absorbed by PSⅡ to the reduction of intersystem electron acceptors[9]

2.3 数据处理与统计分析

采用 SPSS 19.0 软件对测试藻样的光合荧光参数进行统计分析,利用单因素方差分析（ANOVA）方法及 Tukey post-hoc 多重检验方法分析不同质量浓度氯乙酸与三氯乙腈胁迫下蛋白核小球藻处理组与空白对照组之间的差异,$0.01 \leqslant p < 0.05$ 表示处理组与空白对照组之间具有显著性差异,$p < 0.01$ 表示处理组与空白对照组之间具有极显著性差异。

为了评估不同光合荧光参数对消毒副产物氯乙酸和三氯乙腈的响应特性,采用式（3）计算不同质量浓度消毒副产物胁迫下蛋白核小球藻相应光合荧光参数的抑制率。

$$I_t = \frac{(P_c - P_s)}{P_c} \times 100\% , \qquad (3)$$

式中：t 表示暴露时间；P_c 表示暴露时间为 t 时消毒副产物胁迫下蛋白核小球藻的光合荧光参数；P_s 表示暴露时间为 t 时空白对照样蛋白核小球藻的光合荧光参数；I_t 表示暴露时间为 t 时光合荧光参数的抑制率。

利用 Origin 2021 软件的阻滞增长（Logistic）模型对光合荧光参数抑制率与消毒副产物质量浓度之间的剂量-效应关系进行非线性拟合，并根据拟合后的 Logistic 剂量-效应关系曲线，计算两种消毒副产物的 10% 效应质量浓度（EC_{10}）值与 50% 效应质量浓度（EC_{50}）值及其 95% 置信区间。

3 结果与讨论

3.1 蛋白核小球藻对氯乙酸及三氯乙腈毒性响应的最佳实验条件

藻细胞的生长期、藻细胞密度及毒性响应的环境温度均是微藻对氯化消毒副产物毒性响应的关键影响要素。为了准确评估蛋白核小球藻的不同光合荧光参数对消毒副产物毒性的响应特性，研究了不同生长时期蛋白核小球藻的光合活性变化规律及藻细胞密度与环境温度对氯乙酸及三氯乙腈毒性响应灵敏度的影响，从而选出有利于提高蛋白核小球藻对氯乙酸及三氯乙腈毒性响应灵敏度的最佳实验条件。

具有较好光合活性的藻细胞在提高污染物毒性响应灵敏度方面具有重要作用。为了选出具有最好光合活性的藻细胞生长时期，分析了蛋白核小球藻不同光合荧光参数随培养时间的变化规律，结果如图 1 所示。从图 1 可以看出，无论是以 F_v/F_m、F_m/F_o、F_v/F_o 还是以 PI_{ABS} 作为光合活性的指示参数，随着蛋白核小球藻培养时间的延长，这 4 个光合荧光参数均呈先快速递增再缓慢降低的变化趋势。当蛋白核小球藻培养至第 3～4 天时，参数 F_v/F_m、F_m/F_o、F_v/F_o 和 PI_{ABS} 均达到最大值或处于较高水平。该结果表明，当蛋白核接种后培养至第 3～4 天时，其具有最好的光合活性。因此，以蛋白核小球藻为受试生物开展不同光合荧光参数对氯化消毒副产物毒性响应特性的研究时，3～4 d 是蛋白核小球藻的最佳生长时期。

以培养至第 3 天的蛋白核小球藻为受试生物，当蛋白核小球藻与氯乙酸及三氯乙腈反应液中藻细胞密度由 0.1×10^5 cells·mL^{-1} 增加到 100×10^5 cells·mL^{-1} 时，20.17 mg·L^{-1} 氯乙酸和 7.73 mg·L^{-1} 三氯乙腈胁迫 2 h 的蛋白核小球藻 PI_{ABS} 的抑制率随藻细胞密度的变化如图 2（a）所示。从图 2（a）可以看出，当藻细胞密度由 0.1×10^5 cells·mL^{-1} 增加到 0.5×10^5 cells·mL^{-1} 时，氯乙酸胁迫下的蛋白核小球藻 PI_{ABS} 抑制率由 42.45% 增加到 58.44%，三氯乙腈胁迫下的蛋白核小球藻 PI_{ABS} 抑制率由 63.87% 增加到 80.40%，二者的抑制率均出现较大的变化。当藻细胞密度处在 $0.5 \times$
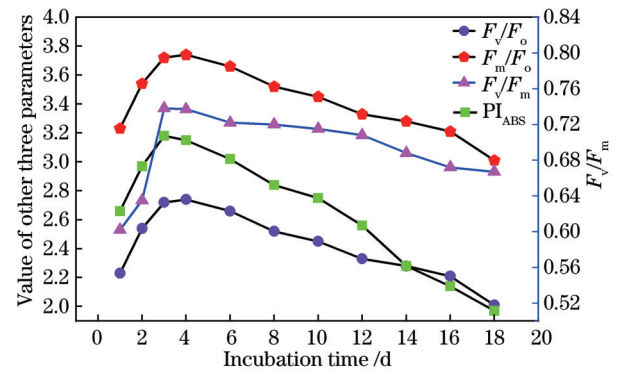

图 1 蛋白核小球藻的 4 个光合荧光参数随培养时间的变化

Fig. 1 Changes of four photosynthetic fluorescence parameters of *Chlorella pyrenoidosa* with incubation time

10^5 cells·mL^{-1}～100×10^5 cells·mL^{-1} 范围时，氯乙酸及三氯乙腈胁迫下的蛋白核小球藻 PI_{ABS} 抑制率分别在 56.75%～61.55% 及 78.48%～81.98% 范围内呈现较小程度的波动，与 0.1×10^5 cells·mL^{-1} 藻细胞密度时的结果相比，此细胞密度范围的蛋白核小球藻 PI_{ABS} 抑制率处于较高值并趋于稳定。因此，0.5×10^5 cells·mL^{-1}～100×10^5 cells·mL^{-1} 是蛋白核小球藻不同光合荧光参数对氯化消毒副产物毒性响应特性研究的最佳藻细胞密度。后续开展蛋白核小球藻光合荧光参数 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m 及 PI_{ABS} 对不同质量浓度氯乙酸及三氯乙腈的毒性响应研究时，将统一选择 5×10^5 cells·mL^{-1} 为反应液中蛋白核小球藻的藻细胞密度。

当以培养至第 3 天的蛋白核小球藻为受试生物，蛋白核小球藻与氯乙酸及三氯乙腈反应液中藻细胞密度为 5×10^5 cells·mL^{-1} 时，不同环境温度下 20.17 mg·L^{-1} 氯乙酸和 7.73 mg·L^{-1} 三氯乙腈胁迫 2 h 的蛋白核小球藻 PI_{ABS} 的抑制率如图 2（b）所示。当环境温度由 5 ℃增加到 25 ℃时，氯乙酸及三氯乙腈胁迫下的蛋白核小球藻 PI_{ABS} 的抑制率均呈逐渐递增的变化趋势；当环境温度由 25 ℃增加到 35 ℃时，PI_{ABS} 的抑制率稍有降低。因此，25 ℃更有利于提高蛋白核小球藻对氯化消毒副产物毒性响应的灵敏度，是最佳的毒性响应环境温度。

3.2 4 个光合荧光参数随氯乙酸及三氯乙腈质量浓度的变化规律

在上述最佳毒性响应条件下，当暴露时间为 2 h 时，不同质量浓度氯乙酸（5.06～36.80 mg·L^{-1}）及三氯乙腈（1.55～19.32 mg·L^{-1}）胁迫下蛋白核小球藻及空白对照样的 4 个光合荧光参数 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m 及 PI_{ABS} 值如图 3 和图 4 所示，其中：柱条上方的 * 代表 $0.01 \leqslant p < 0.05$，表示处理组与空白对照组间具有显著性差异；** 代表 $p < 0.01$，表示处理组与空白对照组间具有极显著性差异。从图 3 和图 4 可以看出，随着氯乙酸及三氯乙腈质量浓度的逐渐增加，光合荧光参数
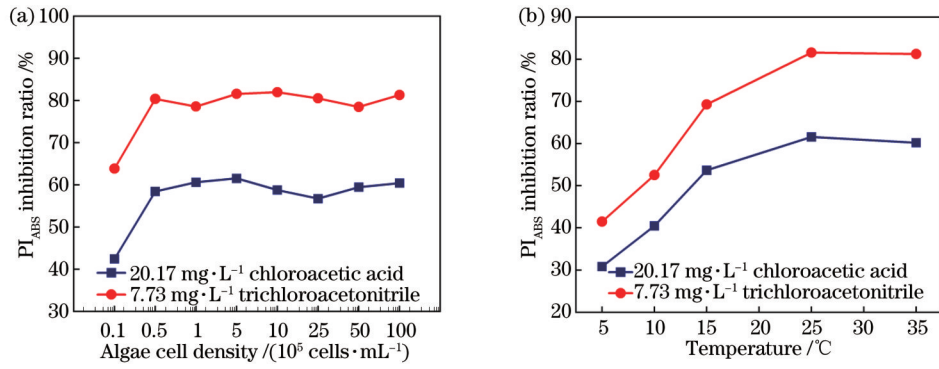
图 2 氯乙酸和三氯乙腈胁迫下蛋白核小球藻 PI_{ABS} 的抑制率随藻细胞密度及环境温度的变化。(a)藻细胞密度;(b)环境温度

Fig. 2 Changes of PI_{ABS} inhibition ratio of *Chlorella pyrenoidosa* exposed to chloroacetic acid and trichloroacetonitrile with algae cell density and environmental temperature. (a) Algae cell density; (b) environmental temperature

F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 值均呈逐渐降低的趋势。当氯乙酸的质量浓度由 5.06 mg·L^{-1} 增加到 36.80 mg·L^{-1} 时,F_v/F_o 值已由空白对照样的 97.61% 降低到 15.03%,F_m/F_o 值由空白对照样的 98.25% 降低到 37.94%,F_v/F_m 值由空白对照样的 99.35% 降低到 39.54%,而 PI_{ABS} 值由空白对照样的 97.49% 降低到 5.54%。同样地,当三氯乙腈的质量浓度由 1.55 mg·L^{-1} 增加到 19.32 mg·L^{-1} 时,F_v/F_o 值由空白对照样的 99.07% 降低到 14.87%,F_m/F_o 值由空白对照样的 99.33% 降低到 38.11%,F_v/F_m 值由空白对照样的 99.75% 降低到 39.01%,而 PI_{ABS} 值由空白对照样的 95.89% 降低到 4.59%。可见,光合荧光参数 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 对氯乙酸及三氯乙腈都具有质量浓度定量响应特性,且与这两种氯化消毒副产物的质量浓度具有负相关性。
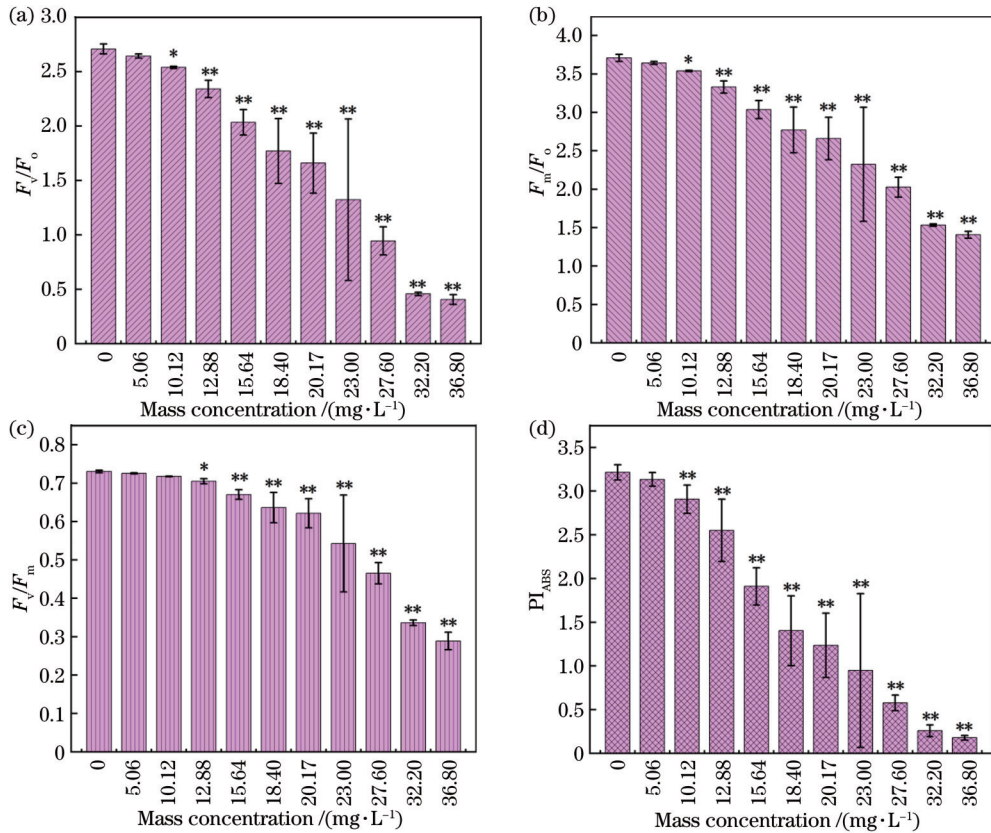

图 3 不同质量浓度的氯乙酸胁迫 2 h 时蛋白核小球藻 4 个光合荧光参数的平均值。(a)F_v/F_o;(b)F_m/F_o;(c)F_v/F_m;(d)PI_{ABS}

Fig. 3 Average values of four photosynthetic fluorescence parameters of *Chlorella pyrenoidosa* stressed by chloroacetic acid with different mass concentrations for 2 h. (a) F_v/F_o; (b) F_m/F_o; (c) F_v/F_m; (d) PI_{ABS}
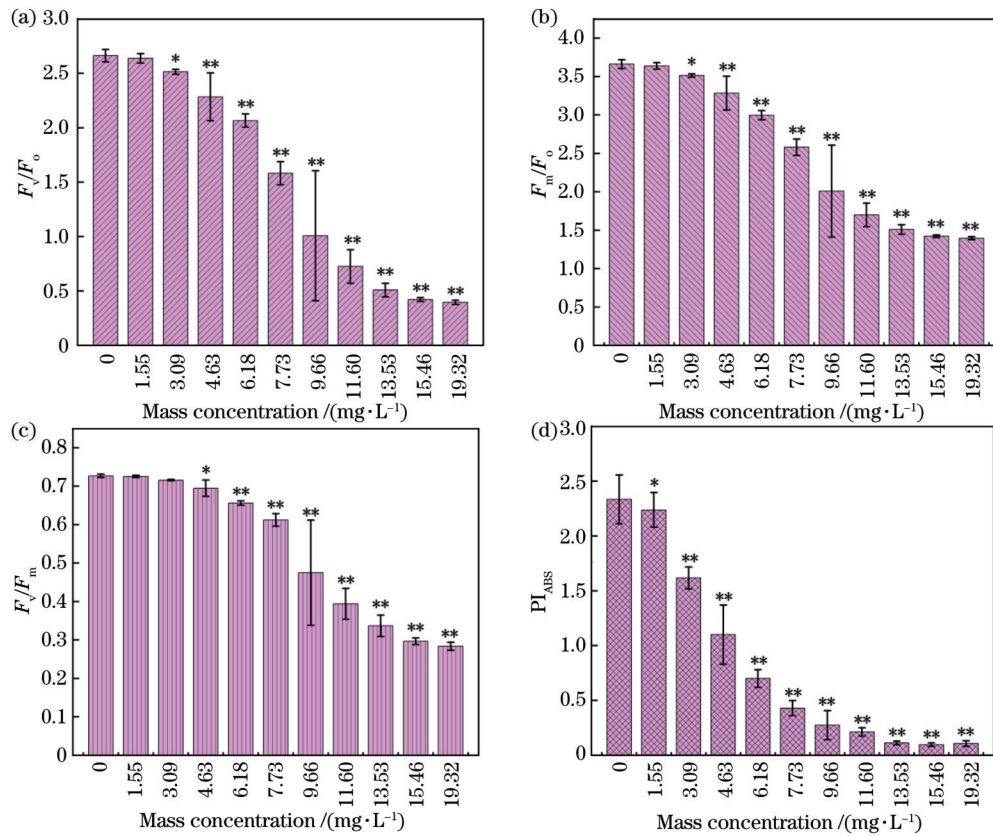
图 4　不同质量浓度三氯乙腈胁迫 2 h 时蛋白核小球藻 4 个光合荧光参数的平均值。(a)F_v/F_o；(b)F_m/F_o；(c)F_v/F_m；(d)PI_{ABS}

Fig. 4　Average values of four photosynthetic fluorescence parameters of *Chlorella pyrenoidosa* stressed by trichloroacetonitrile with different mass concentrations for 2 h. (a) F_v/F_o; (b) F_m/F_o; (c) F_v/F_m; (d) PI_{ABS}

3.3　4 个光合荧光参数与氯乙酸及三氯乙腈质量浓度的剂量-效应关系

由于 4 个光合荧光参数 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 值均随氯乙酸及三氯乙腈质量浓度的变化而改变，因此采用 Logistic 曲线模型研究在暴露时间为 2 h 时，光合荧光参数 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 与氯乙酸及三氯乙腈质量浓度之间的剂量-效应关系。氯乙酸及三氯乙腈质量浓度与蛋白核小球藻光合荧光参数 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 抑制率之间的 Logistic 模型拟合结果如图 5 和图 6 所示。研究表明，当氯乙酸及三氯乙腈的质量浓度分别在 $5.06\sim36.80$ mg·L^{-1} 及 $1.55\sim19.32$ mg·L^{-1} 范围时，F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 的抑制率与氯乙酸及三氯乙腈质量浓度之间具有很好的 Logistic 曲线关系，其中 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 抑制率与氯乙酸质量浓度的 Logistic 曲线定量关系的修正相关系数 R^2_{adj} 分别为 0.9945、0.9939、0.9936 和 0.9949，与三氯乙腈质量浓度的 Logistic 曲线定量关系的修正相关系数 R^2_{adj} 分别为 0.9960、0.9967、0.9965 和 0.9983，均大于 0.993。可见，4 个光合荧光参数与氯乙酸及三氯乙腈质量浓度之间都具有很好的剂量-效应关系，都可作为水体中氯化消毒副产物对蛋白核小球藻毒性定量检测的响应指标。其中，参数 PI_{ABS} 与两种氯化消毒副产物质量浓度之间的剂量-效应关系

曲线的相关性最好，说明与其他 3 个光合荧光参数相比，PI_{ABS} 表征水体氯化消毒副产物毒性定量检测结果的准确性更高。

3.4　光合荧光参数对氯乙酸及三氯乙腈响应灵敏度对比

为了明确光合荧光参数 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 对氯乙酸及三氯乙腈的响应灵敏度，分别从对低质量浓度氯乙酸及三氯乙腈的响应性能、对等质量浓度氯乙酸及三氯乙腈的响应性能及由不同参数获取的两种氯化消毒副产物的 EC_{10} 和 EC_{50} 值这 4 个方面，对比 4 个光合荧光参数对两种氯化消毒副产物的响应特性。

首先，对比不同质量浓度氯乙酸与三氯乙腈胁迫 2 h 时蛋白核小球藻 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 与空白对照样的光合荧光参数之间的差异，结果如图 3 和图 4 所示。从图 3 可以看出，对于氯乙酸，当质量浓度达到 10.12 mg·L^{-1} 时，胁迫下的蛋白核小球藻 F_v/F_o 及 F_m/F_o 与空白对照样 F_v/F_o 及 F_m/F_o 具有显著性差异（$0.01 \leqslant p < 0.05$），而此胁迫下的蛋白核小球藻与空白对照样间的 PI_{ABS} 已具有极显著性差异（$p < 0.01$）。当氯乙酸质量浓度需达到 12.88 mg·L^{-1} 时，胁迫下的蛋白核小球藻与空白对照样间的 F_v/F_m 才具有显著性差异（$0.01 \leqslant p < 0.05$）。对于三氯乙腈胁迫下的蛋白核小球藻（图 4），其与空白对照样在 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、
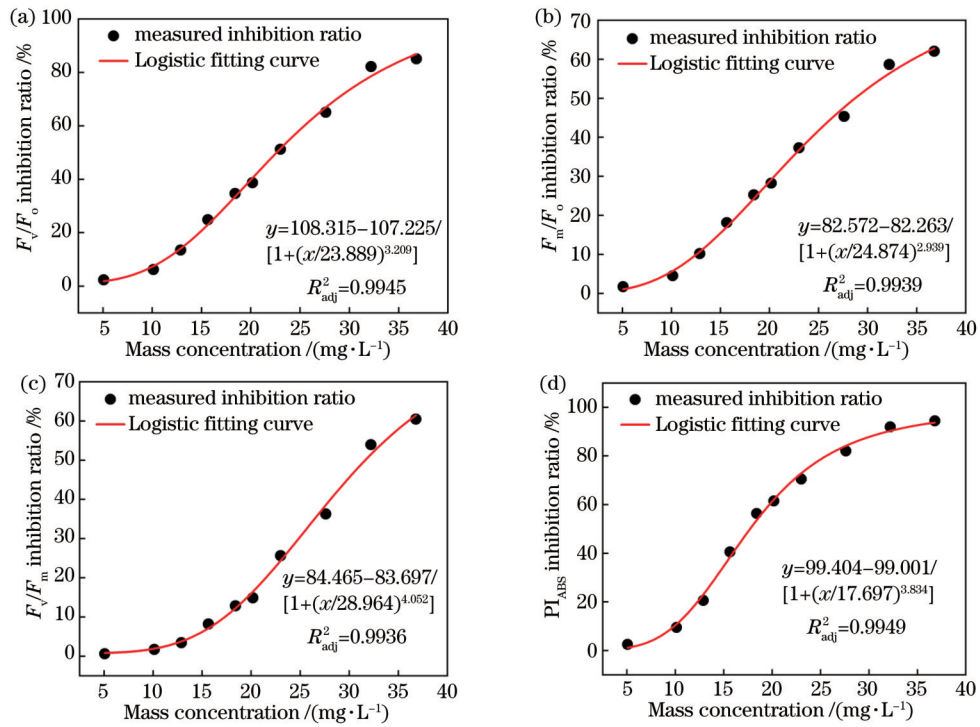
图 5　暴露时间为 2 h 时光合荧光参数与氯乙酸质量浓度的 Logistic 剂量-效应关系曲线。(a)F_v/F_o;(b)F_m/F_o;(c)F_v/F_m;(d)PI_{ABS}

Fig. 5　Logistic dose-response relationship between photosynthetic fluorescence parameters and mass concentration of chloroacetic acid at exposure time of 2 h. (a) F_v/F_o; (b) F_m/F_o; (c) F_v/F_m; (d) PI_{ABS}
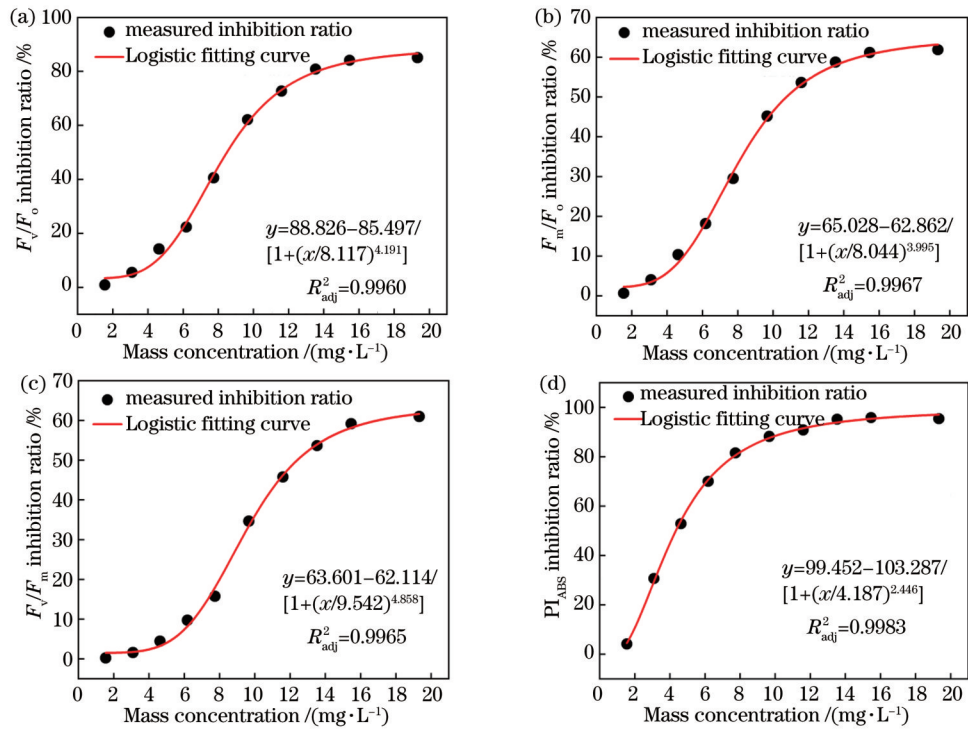
图 6　暴露时间为 2 h 时光合荧光参数与三氯乙腈质量浓度的 Logistic 剂量-效应关系曲线。(a)F_v/F_o;(b)F_m/F_o;(c)F_v/F_m;(d)PI_{ABS}

Fig. 6　Logistic dose-response relationship between photosynthetic fluorescence parameters and mass concentration of trichloroacetonitrile at exposure time of 2 h. (a) F_v/F_o; (b) F_m/F_o; (c) F_v/F_m; (d) PI_{ABS}

PI_{ABS} 4 个参数方面具有显著性差异(0.01≤p<0.05)时所对应的三氯乙腈的最低质量浓度分别为 3.09、3.09、4.63、1.55 mg·L^{-1},具有极显著性差异(p<

0.01)时所对应的三氯乙腈的最低质量浓度分别为 4.63、4.63、6.18、3.09 mg·L^{-1}。因此,4 个光合荧光参数中,PI_{ABS} 对低质量浓度氯化消毒副产物具有最灵

敏的响应性能。

　　其次,对比暴露时间为 2 h 时等质量浓度氯乙酸及三氯乙腈胁迫下蛋白核小球藻 4 个光合荧光参数 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 的抑制率,结果如图 7 所示。从图 7(a)可以看出,对于等质量浓度氯乙酸胁迫下的蛋白核小球藻,在 5.06~36.80 mg·L^{-1} 氯乙酸质量浓度范围内,PI_{ABS} 的抑制率分别是 F_v/F_o 抑制率的 1.04~1.63 倍,是 F_m/F_o 抑制率的 1.44~2.23 倍,而是 F_v/F_m 抑制率的 1.44~2.23 倍,而 PI_{ABS} 平均受抑制的程度分别是 F_v/F_o 的 1.38 倍,是 F_m/F_o 的 1.90 倍,是 F_v/F_m 的 1.90 倍。从图 7(b)可以看出,对于等质量浓度三氯乙腈胁迫下的蛋白核小球藻,在 1.55~19.32 mg·L^{-1} 三

氯乙腈质量浓度范围内,PI_{ABS} 的抑制率分别是 F_v/F_o 抑制率的 1.12~5.51 倍,是 F_m/F_o 抑制率的 1.54~7.58 倍,是 F_v/F_m 抑制率的 1.56~19.42 倍,而 PI_{ABS} 平均受抑制的程度分别是 F_v/F_o、F_m/F_o 和 F_v/F_m 受抑制程度的 2.49 倍、3.38 倍和 6.95 倍。因此,等质量浓度氯乙酸及三氯乙腈胁迫下,4 个光合荧光参数受抑制程度由大到小的顺序均为 PI_{ABS}、F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m,其中 PI_{ABS} 的抑制率最大,受影响程度最高,说明 PI_{ABS} 对等质量浓度氯化消毒副产物的毒性响应最为敏感。但 PI_{ABS} 的灵敏性响应特性导致其抑制率在高质量浓度氯化消毒副产物胁迫下可能会更早出现饱和现象。
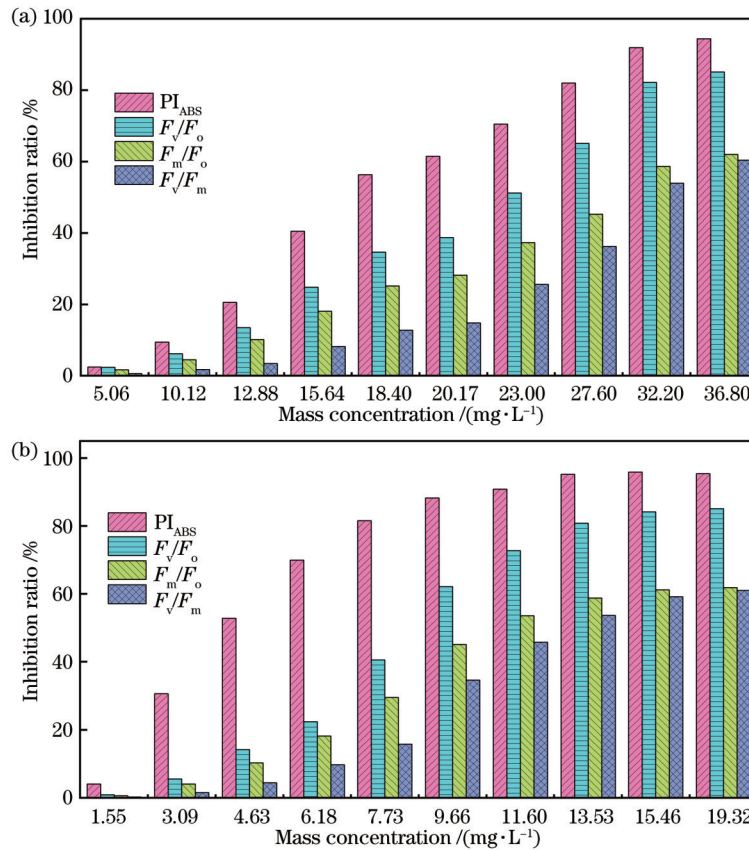
图 7　等质量浓度氯乙酸或三氯乙腈胁迫 2 h 时蛋白核小球藻的光合荧光参数抑制率。(a)氯乙酸;(b)三氯乙腈

Fig. 7　Inhibition ratios of photosynthetic fluorescence parameters of *Chlorella pyrenoidosa* stressed by equal mass concentration of chloroacetic acid or trichloroacetonitrile for 2 h. (a) Chloroacetic acid; (b) trichloroacetonitrile

　　进一步对暴露时间为 2 h,以 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 为响应指标所计算的氯乙酸及三氯乙腈的 EC_{10} 值及 EC_{50} 值进行对比,结果如表 2 所示。从表 2 可以看出:基于不同参数计算的氯乙酸及三氯乙腈的 EC_{10} 值由大到小排序均为 $F_v/F_m > F_m/F_o > F_v/F_o > PI_{ABS}$;基于不同参数计算的氯乙酸及三氯乙腈的 EC_{50} 值由大到小排序也均为 $F_v/F_m > F_m/F_o > F_v/F_o > PI_{ABS}$。对于氯乙酸,基于 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m 计算的 EC_{10} 值分别是基于 PI_{ABS} 计算的 EC_{10} 值的 1.14 倍、1.27 倍和 1.75 倍,其 EC_{50} 值分别是基于 PI_{ABS} 计算的 EC_{50} 值的

1.28 倍、1.62 倍和 1.79 倍;对于三氯乙腈,基于 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m 计算的 EC_{10} 值及 EC_{50} 值分别是基于 PI_{ABS} 所计算出的 EC_{10} 值及 EC_{50} 值的 2.31 倍、2.53 倍、3.35 倍及 1.96 倍、2.48 倍、2.86 倍。由不同光合荧光参数计算的氯乙酸及三氯乙腈的 EC_{10} 值与 EC_{50} 值对比结果可知,4 个光合荧光参数对氯乙酸及三氯乙腈毒性的响应灵敏度由强到弱的顺序为 $PI_{ABS} > F_v/F_o > F_m/F_o > F_v/F_m$。

　　上述分析结果表明,无论是在对低质量浓度及等质量浓度氯乙酸与三氯乙腈毒性响应方面进行对比,

表 2　暴露时间为 2 h 时,基于不同光合荧光参数计算的氯乙酸及三氯乙腈的 EC_{10} 值与 EC_{50} 值及其 95% 置信区间(95%CI)

Table 2　EC_{10} and EC_{50} values and their 95% confidence intervals (95%CI) of chloroacetic acid and trichloroacetonitrile based on different photosynthetic fluorescence parameters when the exposure time is 2 h

Parameter	Chloroacetic acid		Trichloroacetonitrile	
	EC_{10} /(mg·L^{-1}) [95%CI /(mg·L^{-1})]	EC_{50} /(mg·L^{-1}) [95%CI /(mg·L^{-1})]	EC_{10} /(mg·L^{-1}) [95%CI /(mg·L^{-1})]	EC_{50} /(mg·L^{-1}) [95%CI /(mg·L^{-1})]
PI_{ABS}	9.887 (8.587-10.874)	17.715 (17.165-18.277)	1.952 (1.777-2.098)	4.335 (4.197-4.464)
F_v/F_o	11.303 (9.826-12.495)	22.615 (21.867-23.456)	4.503 (3.912-4.998)	8.481 (8.182-8.805)
F_m/F_o	12.540 (11.251-13.638)	28.718 (27.523-29.906)	4.938 (4.553-5.318)	10.748 (10.282-11.260)
F_v/F_m	17.303 (16.117-18.404)	31.629 (30.541-32.701)	6.533 (6.118-6.937)	12.397 (11.901-12.933)

还是在消毒副产物 EC_{10} 与 EC_{50} 方面进行对比,在 F_v/F_o、F_m/F_o、F_v/F_m、PI_{ABS} 4 个光合荧光参数中,PI_{ABS} 是蛋白核小球藻对水体中氯化消毒副产物毒性响应最为敏感的指标,将其作为测试终点能够更有利于提高水体氯化消毒副产物毒性检测的灵敏度。

4　结　　论

蛋白核小球藻光合荧光参数 F_v/F_m、F_v/F_o、F_m/F_o、PI_{ABS} 对两种氯化消毒副产物氯乙酸及三氯乙腈都具有质量浓度依赖性响应特性,每一种光合荧光参数抑制率与氯乙酸及三氯乙腈质量浓度之间都具有较好的 Logistic 曲线关系,均能够用于水体氯化消毒副产物毒性的定量检测。但在 4 种光合荧光参数中,PI_{ABS} 表现出对氯乙酸及三氯乙腈最为灵敏的响应特性,因此 PI_{ABS} 是实现水体氯化消毒副产物毒性现场快速灵敏检测较为合适的响应指标。该研究结果为发展基于荧光动力学方法的水体消毒副产物毒性的现场快速检测方法与技术提供了更为合适的毒性响应参数。同时,水体污染物毒性现场快速检测的重复性、稳定性及灵敏性会受到多种因素影响,因此以 PI_{ABS} 为毒性响应指标进一步建立水体消毒副产物毒性的高灵敏、精准检测方法将是后续研究工作的重点。

参 考 文 献

[1] Kali S, Khan M, Ghaffar M S, et al. Occurrence, influencing factors, toxicity, regulations, and abatement approaches for disinfection by-products in chlorinated drinking water: a comprehensive review[J]. Environmental Pollution, 2021, 281: 116950.

[2] Ding S K, Wu M L, Xiao R, et al. Evaluation of N-acetylcysteine and glutathione as quenching agents for the analysis of halogenated disinfection by-products[J]. Journal of Environmental Sciences, 2022, 117: 71-79.

[3] Sun X F, Chen M, Wei D B, et al. Research progress of disinfection and disinfection by-products in China[J]. Journal of Environmental Sciences, 2019, 81: 52-67.

[4] 庞宇辰, 席劲瑛, 胡洪营, 等. 再生水紫外线-氯联合消毒工艺特性研究[J]. 中国环境科学, 2014, 34(6): 1429-1434.
Pang Y C, Xi J Y, Hu H Y, et al. Evaluation of sequential use of UV irradiation and chlorination to disinfect reclaimed water[J]. China Environmental Science, 2014, 34(6): 1429-1434.

[5] Li Z G, Song G F, Bi Y H, et al. Occurrence and distribution of disinfection byproducts in domestic wastewater effluent, tap water, and surface water during the SARS-CoV-2 pandemic in China[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 55(7): 4103-4114.

[6] 叶利兰, 甘春娟, 陈垚, 等. 疫情防控期间含氯消毒剂大量使用对水生生物的影响综述[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(5): 644-648.
Ye L L, Gan C J, Chen Y, et al. Effect of chlorinated disinfectants usage on aquatic organism during the epidemic control: a review[J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(5): 644-648.

[7] Stalter D, O'Malley E, von Gunten U, et al. Fingerprinting the reactive toxicity pathways of 50 drinking water disinfection by-products[J]. Water Research, 2016, 91: 19-30.

[8] Dong Y, Li F, Shen H J, et al. Evaluation of the water disinfection by-product dichloroacetonitrile-induced biochemical, oxidative, histopathological, and mitochondrial functional alterations: subacute oral toxicity in rats[J]. Toxicology and Industrial Health, 2018, 34(3): 158-168.

[9] Sun C, Xu Y F, Hu N T, et al. To evaluate the toxicity of atrazine on the freshwater microalgae Chlorella sp. using sensitive indices indicated by photosynthetic parameters[J]. Chemosphere, 2020, 244: 125514.

[10] Beaulieu M, Cabana H, Huot Y. Adverse effects of atrazine, DCMU and metolachlor on phytoplankton cultures and communities at environmentally relevant concentrations using Fast Repetition Rate Fluorescence[J]. Science of the Total Environment, 2020, 712: 136239.

[11] Esperanza M, Seoane M, Rioboo C, et al. Early alterations on photosynthesis-related parameters in Chlamydomonas reinhardtii cells exposed to atrazine: a multiple approach study [J]. Science of the Total Environment, 2016, 554/555: 237-245.

[12] Chen M, Yin G F, Zhao N J, et al. Rapid and sensitive detection of water toxicity based on photosynthetic inhibition effect[J]. Toxics, 2021, 9(12): 321.

[13] 亓培龙, 殷高方, 甘婷婷, 等. 藻类光合抑制法的水体综合毒性稳定测试条件研究[J]. 光学学报, 2022, 42(12): 1217001.
Qi P L, Yin G F, Gan T T, et al. Study on test conditions of comprehensive toxicity stability of water body by algae photosynthetic inhibition method[J]. Acta Optica Sinica, 2022, 42(12): 1217001.

[14] 华卉, 殷高方, 赵南京, 等. 基于叶绿素荧光动力学的压载水活体藻细胞数表征参数选择研究[J]. 光学学报, 2021, 41(6): 0617001.
Hua H, Yin G F, Zhao N J, et al. Study on selecting

characterization parameters of viable algae cells number in ballast water based on chlorophyll fluorescence kinetics[J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(6): 0617001.

[15] Shivagangaiah C P, Sanyal D, Dasgupta S, et al. Phycoremediation and photosynthetic toxicity assessment of lead by two freshwater microalgae *Scenedesmus acutus* and *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Physiologia Plantarum, 2021, 173(1): 246-258.

[16] Zhang B L, Duan G Q, Fang Y Y, et al. Selenium（Ⅳ）alleviates chromium（Ⅵ）-induced toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Environmental Pollution, 2021, 272: 116407.

[17] Lichtenthaler H K, Babani F, Navrátil M, et al. Chlorophyll fluorescence kinetics, photosynthetic activity, and pigment composition of blue-shade and half-shade leaves as compared to sun and shade leaves of different trees[J]. Photosynthesis Research, 2013, 117(1): 355-366.

[18] Gajić G, Djurdjević L, Kostić O, et al. Assessment of the phytoremediation potential and an adaptive response of *Festuca rubra* L. sown on fly ash deposits: native grass has a pivotal role in ecorestoration management[J]. Ecological Engineering, 2016, 93: 250-261.

[19] Zhang Z W, Wu P, Zhang W B, et al. Calcium is involved in exogenous NO-induced enhancement of photosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under low temperature [J]. Scientia Horticulturae, 2020, 261: 108953.

Response Characteristics of Different Photosynthetic Fluorescence Parameters of Microalgae to Toxicity of Chlorinated Disinfection By-products

Gan Tingting[1,2,3], Yin Gaofang[1,2,3*], Zhao Nanjing[1,2,3**], Wang Ying[1,2,3], Tan Xiaoxuan[1,2,3], Ye Ziqi[4]

[1]*Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Chinese Academy of Sciences, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, Anhui, China;*
[2]*University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China;*
[3]*Key Laboratory of Optical Monitoring Technology for Environment of Anhui Province, Hefei 230031, Anhui, China;*
[4]*Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui, China*

Abstract

Objective   Due to the advantages such as good inactivation effect on pathogenic microorganisms and low usage cost, chlorinated disinfectants have been widely employed for disinfection in various aspects. However, the large amount of chlorinated disinfection by-products produced by chlorinated disinfectants have biological toxicity, and they will have toxic effects on aquatic organisms and pose potential threats to the aquatic ecosystem once entering aquatic environment. Therefore, the development of on-site and rapid detection methods for the toxicity of chlorinated disinfection by-products in water is of significance for ensuring the aquatic environment safety. As the main primary producers and energy converters in aquatic ecosystems, microalgae play an important role in maintaining the balance and stability of aquatic ecosystems and indicating the water environment quality. Additionally, the microalgae photosynthesis has a rapid response characteristic to the toxicity of pollutants in water. Based on this, fluorescence kinetics technique which could rapidly and non-destructively detect the photosynthetic status of living plants has good development prospects in rapid toxicity detection of chlorinated disinfection by-products in water. However, at present, it is still unclear which photosynthetic fluorescence parameter obtained based on fluorescence kinetics technique can serve as the optimal response indicator for rapidly and sensitively detecting the toxicity of chlorinated disinfection by-products. Therefore, we study the response characteristics of different photosynthetic fluorescence parameters to the toxicity of chlorinated disinfection by-products for determining the optimal response indicator with sensitive response characteristics to chlorinated disinfection by-products. This is of practical significance for the development of on-site and rapid detection methods for the toxicity of chlorinated disinfection by-products based on fluorescence kinetics technology.

Methods   We employ a common freshwater microalgae *Chlorella pyrenoidosa* as the test organism, and two typical toxic chlorinated disinfection by-products chloroacetic acid and trichloroacetonitrile as the research objects. Meanwhile, we first investigate the change rule of photosynthetic activity of *Chlorella pyrenoidosa* with incubation time and the influences of algal cell density and environmental temperature on the response sensitivity of *Chlorella pyrenoidosa* to the toxicity of two chlorinated disinfection by-products to determinate the optimal experimental conditions for the response of *Chlorella*

pyrenoidosa to chlorinated disinfection by-products toxicity. The fluorescence kinetics method is adapted to study the response of four photosynthetic fluorescence parameters F_v/F_m, F_v/F_o, F_m/F_o, and PI_{ABS} to different mass concentrations of chloroacetic acid and trichloroacetonitrile, and then the dose-response relationships between each photosynthetic fluorescence parameter and each chlorinated disinfection by-product are constructed. On this basis, the response sensitivities of four photosynthetic fluorescence parameters to chlorinated disinfection by-products are compared in four aspects. The aspects include response performance to low mass concentration of chlorinated disinfection by-products, inhibition degree by equal mass concentration of chlorinated disinfection by-products, 10% effective mass concentration (EC_{10}), and 50% effective mass concentration (EC_{50}) values.

Results and Discussions   By studying the change of photosynthetic activity of *Chlorella pyrenoidosa* with incubation time, the results show that when *Chlorella pyrenoidosa* is cultured to the third to fourth days, all the four photosynthetic fluorescence parameters F_v/F_m, F_m/F_o, F_v/F_o, and PI_{ABS} are at a high level (Fig. 1), which indicates that *Chlorella pyrenoidosa* has the best photosynthetic activity at this time. Therefore, the best growth period of *Chlorella pyrenoidosa* for studying the response characteristics of different photosynthetic fluorescence parameters to the toxicity of chlorinated disinfection by-products is the third day to the fourth day during culture. The results of influences of algal cell density and environmental temperature on PI_{ABS} inhibition ratio of *Chlorella pyrenoidosa* exposed to chloroacetic acid and trichloroacetonitrile demonstrate that when the algal cell density is in the range of 0.5×10^5–100×10^5 cells·mL^{-1}, PI_{ABS} inhibition ratio is at a high level and tends to stabilize [Fig. 2 (a)]. Under the environmental temperature of 25 ℃, the inhibition ratio of PI_{ABS} is the maximum [Fig. 2 (b)]. Therefore, 0.5×10^5–100×10^5 cells·mL^{-1} and 25 ℃ are the optimal algal cell density and the optimal environmental temperature for the response of *Chlorella pyrenoidosa* to chlorinated disinfection by-products toxicity respectively. In the optimal toxicity response conditions, when the exposure time is 2 h, all the four photosynthetic fluorescence parameters F_v/F_o, F_m/F_o, F_v/F_m, and PI_{ABS} values gradually decrease with the mass concentration increase in chloroacetic acid and trichloroacetonitrile (Figs. 3 and 4). When the mass concentrations of chloroacetic acid and trichloroacetonitrile are in the ranges from 5.06 to 36.80 mg·L^{-1} and from 1.55 to 19.32 mg·L^{-1} respectively, all the inhibition ratios of F_v/F_o, F_m/F_o, F_v/F_m, and PI_{ABS} show good Logistic curve relationships with the mass concentrations of chloroacetic acid and trichloroacetonitrile, and the adjustive correlation coefficients R_{adj}^2 are all greater than 0.993 (Figs. 5 and 6). These results indicate that all four photosynthetic fluorescence parameters could be adopted as response indicators for quantitative toxicity detection of chlorinated disinfection by-products. For low mass concentrations of chloroacetic acid and trichloroacetonitrile, PI_{ABS} has the most sensitive response performance compared to F_v/F_o, F_m/F_o, and F_v/F_m (Figs. 3 and 4). Meanwhile, by comparing the inhibition ratios of F_v/F_o, F_m/F_o, F_v/F_m, and PI_{ABS} by equal mass concentration chloroacetic acid and trichloroacetonitrile at the exposure time of 2 h, the inhibition degree order of the four photosynthetic fluorescence parameters is $PI_{ABS}>F_v/F_o>F_m/F_o>F_v/F_m$. This indicates that compared with the other three photosynthetic fluorescence parameters, PI_{ABS} is the most sensitive to the toxicity of chlorinated disinfection by-products at the same mass concentration. Additionally, the EC_{10} and EC_{50} values of chloroacetic acid and trichloroacetonitrile calculated according to F_v/F_o, F_m/F_o, F_v/F_m, and PI_{ABS} are further compared. The results show that the photosynthetic fluorescence parameters corresponding to the EC_{10} and EC_{50} values of chloroacetic acid and trichloroacetonitrile in descending order are $F_v/F_m>F_m/F_o>F_v/F_o>PI_{ABS}$ (Table 2). This indicates that the sensitivity of the four photosynthetic fluorescence parameters to the toxicity of chloroacetic acid and trichloroacetonitrile is $PI_{ABS}>F_v/F_o>F_m/F_o>F_v/F_m$.

Conclusions   All the photosynthetic fluorescence parameters F_v/F_m, F_v/F_o, F_m/F_o, and PI_{ABS} of *Chlorella pyrenoidosa* have mass concentration-dependent response characteristics to two chlorinated disinfection by-products chloroacetic acid and trichloroacetonitrile. The four photosynthetic fluorescence parameters have good logistic curve dose-response relationships with the mass concentration of chloroacetic acid and trichloroacetonitrile, which could be utilized for quantitative toxicity detection of chlorinated disinfection by-products in water. In addition, among the four photosynthetic fluorescence parameters, PI_{ABS} exhibits the most sensitive response characteristics to chloroacetic acid and trichloroacetonitrile. Therefore, it is a suitable response indicator for rapidly and sensitively detecting the toxicity of chlorinated disinfection by-products. We provide a more suitable toxicity response parameter for the development of on-site and rapid detection methods and technologies for disinfection by-products toxicity based on fluorescence kinetics technique.

Key words   spectroscopy; fluorescence; chlorinated disinfection by-product; biological toxicity; microalgae; fluorescence kinetics; photosynthetic fluorescence parameter